

**Ein Beitrag zur Aufschließung unbekannter
Gewebsextrakte durch den Nachweis
von Eiweißbausteinen
mit Hilfe der Papierchromatographie**

Alfons Kaul

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik München
Direktor: Professor Dr. E. K. FREY

Ein Beitrag zur Aufschliessung unbekannter Gewebsextrakte
durch den Nachweis von Eiweissbausteinen mit Hilfe der
Papierchromatographie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Alfons Kaul

aus

Deggendorf

München 1958



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. E. K. FREY

Dekan: Professor Dr. W. BÜNGELER

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juni 1958

Meinen lieben Eltern

in Dankbarkeit

Herrn Professor Dr. E.K. Frey danke ich für die freundliche
Überlassung des Arbeitsplatzes im Laboratorium des Chirurgisch -
Klinischen Institutes der Universität München

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. W. Harten-
bach für die mir bei meiner Arbeit stets gewährte Unterstützung.

Bei der Erlernung der Methode war mir Fräulein Dr. L. Maier
freundlicherweise behilflich.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I EINLEITUNG	9
II THEORETISCHER TEIL	
A) DIE PAPIERCHROMATOGRAPHIE	
1. Das Wesen der Papierchromatographie und ihre Def.	10
2. Adsorptions- und Verteilungschromatographie	10
3. Arten der Papierchromatographie	12
4. Ideale Verhältnisse bei der exakten Trennung	12
5. Der R_F - Wert	13
B) METHODIK DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE	
1. Das Präparieren des Chromatogramms	14
2. Das Entwickeln des Chromatogramms	15
C) DIE GEWEBSEXTRAKTE UND IHRE GEWINNUNG	16
III EXPERIMENTELLER TEIL	
A) KONZENTRATION DER SUBSTANZEN	18
B) DIE LÖSUNGSMITTELSYSTEME	18
C) CHEMISCHE FARBREAKTIONEN	19
Chromatogramme	22-32
D) DEUTUNG DER ERGEBNISSE	33
E) KREATIN - KREATININ	

1. Bildung des Kreatins	34
2. Vorkommen, Speicherung und Ausscheidung	35
3. Kreatin als Energiespeicher im Kohlehydratabbau	36
4. Bedeutung für die Muskelkontraktion	37
5. Die Wirkung des Kreatinsystems und die der Gewebsextrakte	38

IV ZUSAMMENFASSUNG	41
--------------------	----

LITERATURVERZEICHNIS	42
----------------------	----

I EINLEITUNG

Die Entwicklung der Papierchromatographie kann als einer der grössten Fortschritte auf dem Gebiet der experimentellen Eiweissforschung bezeichnet werden. Vor allem MARTIN, SYNGE u. GORDON waren es, die das Verfahren der Verteilungschromatographie schufen und damit die Trennung hydrophiler Stoffe, speziell die Trennung von Aminosäuren ermöglichten (14).

Bei den ersten Versuchen fanden mit Wasser getränkte Silikagelsäuren Verwendung und als diese 1944 durch Papierstreifen ersetzt wurden, begann auf dem Sektor der Proteinchemie das Zeitalter der Papierchromatographie (25).

Die ausgezeichnete Leistungsfähigkeit und nahezu generelle Anwendbarkeit machten dieses Verfahren zur Methode der Wahl, zumal die Papierchromatographie als Mikromethode mit kleinsten Substanzmengen zu arbeiten vermag.

Mit ihrer Hilfe wurde es erst möglich, sämtliche, in Proteinen vorkommende Aminosäuren zu trennen.

Die Papierchromatographie ist in erster Linie eine qualitative Untersuchungsmethode; sie fand aber auch Eingang in die quantitative Bestimmung bereits ermittelter Substanzen.

Heute spielt sie bei der Charakterisierung von Peptiden durch Ermittlung der Aminosäurenreste nach vorhergegangener Hydrolyse eine genau so bedeutende Rolle (1), wie bei der Papierelektrophorese, denn hier können die im elektrischen Feld getrennten Bestandteile im chromatographischen Versuch weiter differenziert werden (2).

II THEORETISCHER TEIL

A. DIE PAPIERCHROMATOGRAPHIE

1) Das Wesen der Papierchromatographie und ihre Definition.

Um das Wesen der Papierchromatographie besser zu verstehen, sei bereits hier vorweggenommen: Bei diesem Verfahren erfolgt die Trennung eines Proteingemisches unter Ausnützen der Kapillarität, bzw. der kapillaren Kräfte eines Filterpapiers. Nach Aufbringen relativ kleiner Mengen der zu analysierenden Lösung auf einem Papierstreifen, taucht dieser in ein wasserhaltiges, organisches Lösungsmittel, saugt es an und wird zum Träger der wässrigen stabilen Phase.

Beim Hochsteigen der Lösungsmittelfront werden die einzelnen Aminosäuren mit der beweglichen organischen Phase jeweils bis zu der, für sie charakteristischen Steighöhe mitgeführt. Durch nachträgliche Färbung sichtbar gemacht, können die chromatographischen Zonen und damit die Aminosäuren auf Grund ihrer Wanderungsgeschwindigkeit identifiziert werden.

Demnach bezeichnet man heute als Chromatographie im allgemeinen ein Verfahren, bei dem eine Lösung zu trennender Stoffe eine feste (unlösliche) Substanz, die in mehr oder weniger fein verteilter Form vorliegt, in einer bestimmten Richtung durchströmt, wobei die einzelnen Komponenten, gleichgültig durch welchen Mechanismus (Adsorption, Verteilung, Ionenaustausch) selektiv verzögert werden (3).

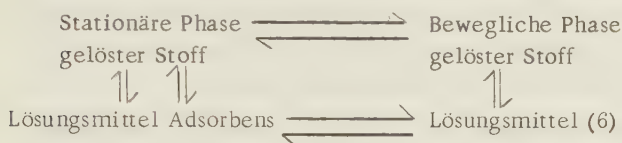
Als allgemeine Formulierung kann die unterschiedliche, gerichtete Wanderung der zu trennenden Stoffe durch ein mehr- meist zweiphasiges System, unter Ausbildung reversibler Gleichgewichte gelten (26).

2) Adsorptions - und Verteilungschromatographie.

Die Papierchromatographie ist im wesentlichen eine Verteilungschromatographie. Verteilung und Adsorption können aber im gleichen System nebeneinanderstehen, so dass eine strenge Unterscheidung der zu Grunde liegenden theoretischen Prinzipien nicht immer gegeben ist (4).

Vorwiegend um Adsorptionsvorgänge handelt es sich wohl bei der Papierchromatographie von Proteinen aus wässrigen Lösungen, wobei die Form der Proteinmoleküle eine wichtige Rolle spielt, da asymmetrische Moleküle stärker festgehalten werden (5).

Bei Adsorptionsvorgängen besteht ein Wechselspiel zwischen Adsorbens, adsorbierbarem Stoff und Lösungsmittel:



Im Falle der reinen Verteilung hingegen müssen nur die Kräfte zwischen Molekülen des gelösten Stoffes und des Lösungsmittels in Rechnung gestellt werden.

Die Zellulose des Papiers stellt in kleinen Bereichen kristalline Polysaccharide dar, die ihrerseits starke Neigung zur Quellung mit Wasser besitzen. Vermöge der zahlreichen OH - Gruppen des Polysaccharids können in den freien Gitterräumen grosse Mengen Wasser festgehalten werden. Die Zellulose in ihrer gequollenen Form ist letzten Endes die chromatographisch wirksame Phase. Sie bildet die wässrige Phase des Verteilungschromatogramms, in der sich die hydrophilen Molekel lösen, sich mit der vorbeiströmenden organischen Phase ins Gleichgewicht setzen und schliesslich festgehalten werden. Man kann daher von einer Verteilung zwischen einer wässrigen Phase, die aus dem Wasser des Lösungsmittels und der Zellulose besteht, und einer wasserhaltigen organischen Phase sprechen, die an der wasserüberzogenen Zellulose vorbeifliesst (27).

Eine Spaltung in diese beiden Phasen ist bedingt durch die starke Wasseraffinität der Zellulose. Dabei ist entscheidend, dass im verwendeten organischen Lösungsmittelsystem mindestens ein fünfprozentiger Wasserzusatz nötig ist, um eine chromatographische Trennung überhaupt zu ermöglichen.

Bei dieser kontinuierlichen Folge von Verteilungsprozessen zwischen einer wässrigen stationären und einer beweglichen organischen Phase müssen die zu trennenden Stoffe mindestens teilweise wasserlöslich sein. Ist die-

se Bedingung erfüllt, so werden sie vom feuchten Papier festgehalten und bilden chromatographische Zonen (15).

3) Arten der Papierchromatographie.

Die Papierchromatographie findet heute in verschiedenen Variationen ihre Anwendung. Die gebräuchlichste Methode ist die eindimensionale Papyrographie bei der ein Filterpapierstreifen das Lösungsmittel ansaugt und zwar mit auf - oder absteigender Flüssigkeitsfront. Das erste Verfahren führt zu längeren Laufzeiten und damit zu einer genaueren Trennung der punktförmig angeordneten chromatographischen Zonen.

Ein weiteres Verfahren arbeitet mit Rundfiltern, wobei die Chromatogramme konzentrische Ringe aufweisen.

Schliesslich sei noch die zweidimensionale Papierchromatographie genannt, die von allen Methoden die genaueste Trennung zulässt.

4) Ideale Verhältnisse bei der exakten Trennung.

Um eine exakte Trennung der einzelnen Aminosäuren aus einem Proteinhydrolysat zu erhalten, muss man folgende Punkte beachten :

- a) Das verwendete Papier muss ein reines Linterspapier sein, das weder lösliche Leime, noch Zusatzstoffe enthält. Ausser einer bestimmten Saugfähigkeit, die von der Dicke des Papiers abhängt, muss es eine gleichmässige Textur aufzeigen und in Laufrichtung vom Lösungsmittel durchströmt werden (16).
- b) Das verwendete organische Lösungsmittelsystem muss wenigstens teilweise wassermischbar sein. Die bewegliche, lipophile Phase wird so gewählt, dass die Wanderung der Substanzen zur Wanderung der Flüssigkeitsfront relativ langsam erfolgt; die Wanderungsgeschwindigkeit der Front soll drei Zentimeter pro Stunde nicht überschreiten. Zur Erzielung idealer Verhältnisse wählt man die Zusammensetzung der Phasen nahe ihrer Mischungsgrenzen (7).

Was die Wanderungsgeschwindigkeit angeht, zeigt jede papierchromatographisch analysierbare Verbindung, je nach Wahl des verwendeten Lösungsmittels eine für sie charakteristische Steighöhe. Grundsätzlich aber wandern länger-kettige Aminosäuren schneller (22), da sie in der lipophilen Phase stärker löslich sind (24).

Die Wahl des Lösungsmittelsystems erfolgt auf empirischem Weg. Der Wasserzusatz darf nicht zu hoch gewählt werden. Er führt zu einer allgemeinen Erhöhung aller R_F - Werte, macht diese einander immer ähnlicher und schliesst so eine Identifizierung der chromatographischen Zonen aus (10).

- c) Die ursprünglich ungefärbten Substanzen werden, im Gegensatz zur Säulenchromatographie, nachträglich durch geeignete chemische Farbreaktionen zur Darstellung gebracht. Erst danach ist eine genaue Lokalisation und damit auch die Identifizierung der gefundenen Substanz möglich.

5) Der R_F - Wert.

Bei der Bestimmung und der eventuellen Reproduktion der gefundenen chromatographischen Zone - unter Angabe der Wanderungszeit, Art des Lösungsmittels und der Papiercharge - kommt uns der sogenannte R_F - Wert zu Hilfe (17).

Unter R_F - Wert versteht man den Zonenschwerpunkt, das heisst, den Ort grösster Konzentration (ratio of front).

Er ist das Mass für die Wanderungsgeschwindigkeit einer Verbindung und definiert als Quotient aus Entfernung der Substanz vom Ausgangspunkt und Entfernung der Lösungsmittelfront vom Ausgangspunkt.

$$R_F = \frac{\text{Strecke vom Startpunkt bis zur Substanz}}{\text{Strecke vom Startpunkt bis zur Lösungsmittelfront}}$$

Daraus geht hervor, dass alle R_F - Werte kleiner oder gleich 1 sind (17).

Genaue R_F - Werte erhält man nur, wenn man auf die Konstanthaltung der Phasenzusammensetzung und damit auf Temperaturkonstanz achtet. Eine Temperaturerhöhung bedingt zunehmende Wanderungsgeschwindigkeit der Aminosäuren (8); eine pH - Änderung des Milieus hat Einfluss auf die Genauigkeit der R_F - Werte, veresterte Alkohol- Säuren- Lösungsmittelgemische zeigen ähnliche Ergebnisse (9).

Anorganische Salze und Ionen höherer Konzentration bedingen Schwanzbildung (tailing) der sonst schwarzbegrenzten Zonen, da die Ionen als

hydrophile Teilchen Wasser anziehen und das Wassergleichgewicht zwischen den Phasen stören (18).

B. METHODIK DER PAPIERCHROMATOGRAPHIE

1) Das Präparieren des Chromatogramms.

Die Papierchromatographie ist eine Mikromethode zur Analyse von Aminosäuren und Eiweissbausteinen. Sie kann normalerweise mit Mengen bis zu 60 μ g eines jeden Stoffes arbeiten. Eine untere Grenze lässt sich nicht angeben; sie ist nur dadurch bedingt, dass die Substanz bei der Farbreaktion gerade noch erfassbar sein muss.

Man markiert mit dem Bleistift auf dem Filterpapierbogen eine Startlinie etwa vier Zentimeter vom unteren Rand und auf dieser Linie in jeweils drei Zentimeter seitlichem Abstand die Startpunkte für Untersuchungslösung und Vergleichslösungen. Mit einer Mikropipette wird durch direktes Aufsetzen dieser 0,01 ccm auf die Startpunkte aufgebracht. Die Lösung fließt aus, saugt sich in das Papier und bildet einen Startfleck, der einen Durchmesser von 1,5 cm nicht überschreiten soll (20).

Die wässrigen Vergleichslösungen, Verdünnungen chemisch reiner, bekannter Aminosäuren, werden ebenso auf die Startpunkte aufgebracht, wobei auch hier die wässrige Komponente im Warmluftstrom weggetrocknet wird.

Sowohl die Art als auch die Mengen der Wirksubstanz jeder Lösung wird unterhalb des Startpunktes notiert. Anschliessend wird der Filterbogen zu einem Zylinder zusammengerollt, die freien Enden werden aneinander genäht und der so entstandene Papierzylinder in die Chromatographiekammer eingebracht.

Diese besteht im einfachsten Fall aus einer geschliffenen Glasplatte und einer darübergestülpten Glasglocke. Auf dem Boden der Apparatur steht eine mit dem Lösungsmittel gefüllte Petrischale in die der Zylinder ge-

stellt wird (22). Glasplatte und Glocke werden luftdicht nach außen abgeschlossen, so daß in der Chromatographiekammer eine gesättigte Atmosphäre entsteht und die lipophile und wässrige Phase des Lösungsmittels aus dem Papier nicht verdunsten kann.

Inzwischen hat sich das Lösungsmittel an dem Papier hochgelaugt und die Startlinie erreicht. Vom Überschreiten der Startlinie durch die Flüssigkeitsfront rechnet man die Wanderungs- oder Laufzeit des Chromatogramms. Da sich die Laufgeschwindigkeit bei der aufsteigenden Chromatographie verlangsamt, läßt man die Lösungsmittelfront bei maximal 40 cm hochsteigen, nimmt den Zylinder aus der Kammer und markiert die Flüssigkeitsfront. Der Zylinder wird eingelegt und das Chromatogramm im Warmluftstrom getrocknet (11).

2) Das Entwickeln des Chromatogramms.

Sofern die chromatographischen Zonen auf dem Papier weder durch Eigenfarbe, noch durch Fluoreszenz sichtbar sind, werden sie anschließend durch Behandlung mit chemischen Reagenzien entwickelt.

Mittels eines Zerstäubers wird der Papierzug mit einer Reagenzlösung besprüht, bis er gleichmäßig feucht ist, aber nicht tropft. Auf diese Weise vermeidet man eine Verwaschung der Flecken.

Ein Erwärmen auf 70 - 100 Grad ist meist erforderlich, um die Sichtbarkeit der chromatographischen Zonen zu steigern (21).

Unter Zuhilfenahme der mitgelieferten Testlösungen kann man auf dem fertigen Chromatogramm auf Folgerichtigkeit, Form der Flecken und vor allem gleicher Höhe der chromatographischen Zonen, die einzelnen Aminosäuren und Eiweißsaureide in der Untersuchungslösung nachweisen oder ausschließen. Die Flecken werden umrandet, ihre Mittelpunkte markiert und die jeweiligen R_f -Werte berechnet und ermittelt.

Somit ist die eindimensionale aufsteigende Papierchromatographie die Methode der Wahl für die Identifizierung kleiner Substanzenmengen, zumal sie mit einem Minimum an Zeit und Aufwand arbeitet. Ihre Anwendung ist immer dann gegeben, wenn die zu untersuchenden Substanzen

- 1) sowohl in der wässrigen als organischen Phase wenigstens teilweise löslich sind,

- 2) durch chemische Farbreaktionen auf dem Papier sichtbar und somit nachgewiesen werden können und
- 3) weder mit der Zellulose des Papiers, noch mit dem Lösungsmittel eine Reaktion eingehen (19).

C. DIE GEWEBSEXTRAKTE UND IHRE GEWINNUNG

In den anschliessend beschriebenen Versuchen kamen in Ampullen abgefüllte Gewebsextrakte mit den Bezeichnungen E22, VP12d, 106R, α , Do/II und DC100 zur Untersuchung. Es sind dies uns unbekannte Gewebsextrakte verschiedener Tiergattungen und verschiedener Organe, die nach der Methode von FILATOW gewonnen wurden.

Die heutige Therapie mit Gewebsextrakten geht zurück auf W. P. FILATOW und beruht auf folgender Hypothese (29) :

Jedes menschliche, tierische oder pflanzliche Gewebe unterliegt einem biochemischen Umbau, wenn es, vom Organismus abgetrennt unter ungünstigen, aber nicht tödlich wirkenden Bedingungen aufbewahrt wird. Es passt sich an die subletalen Bedingungen an unter Bildung bestimmter Stoffe, der biogenen Stimulatoren, die in ihrem Muttergewebe die biochemischen Lebensprozesse unterhalten.

In dem vom Organismus abgetrennten Gewebstück ist die Blutzirkulation und damit die Ernährung der Zelle unterbrochen. Die Gewebsatmung ist weitgehend erschwert und nur auf Grund der gestörten Stoffwechsellaage ist ein Aufbau von biogenen Stimulatoren möglich. Wirklich tote Gewebe, die keinen Stoffwechsel mehr aufweisen, besitzen nicht die Fähigkeit zur Bildung solcher Substanzen.

Bei Einführung in einen kranken Organismus verstärken die biogenen Stimulatoren in diesem die vitalen Reaktionen, aktivieren dessen Lebensprozesse und führen zu einer Intensivierung des Stoffwechsels. Sie wirken auf den gesamten Organismus ein, indem sie seine regenerativen Fähigkeiten stärken und den Widerstand gegen pathogen wirkende Faktoren erhöhen.

Eine Hebung der Körperfunktionen bleibt unter dem Einfluss der biogenen Stimulatoren über mehrere Wochen erhalten, wobei die Verwendung von Gewebsextrakten auch über Monate hinaus keine nachteiligen Erscheinungen zur Folge hat.

Die biogenen Stimulatoren sind weder art- noch organspezifisch, weder Eiweisskörper, noch Fermente, sie sind thermostabil und wasserlöslich. Sie kommen in grösseren Mengen bei der Lagerung von Organen vor, die mehrere Tage bei +2 - 4 Grad gehalten werden. Nach mehrmaligem Waschen des Organs mit destilliertem Wasser wird es zerkleinert, im Verhältnis 1:10 mit isotoner Kochsalzlösung versetzt und eine Stunde bei 15 Grad gehalten. Anschliessend erwärmt man das Eluat (die Gewebsmasse) 20 bis 30 Minuten auf 80 Grad, lässt es kurz aufkochen und filtert durch ein Papierfilter. Das Filtrat wird abermals zum Sieden gebracht, in Ampullen abgefüllt und verschlossen.

Der gewonnene Extrakt wird über eine Stunde bei 120 Grad sterilisiert, wobei eine geringe Aktivitätszunahme der biogenen Stimulatoren zu verzeichnen ist (29).

III EXPERIMENTELLER TEIL

A. KONZENTRATION DER SUBSTANZEN

Bei allen Versuchen, die wir mit Gewebsextrakten machten, liessen wir auf dem Chromatogramm Testsubstanzen mitlaufen, sowohl als reine Vergleichslösung, als auch im Gemisch mit anderen. Dabei wählten wir die Verdünnung so, dass auf eine Mikropipette (0,01 ccm) 20 μ Reinsubstanz kam.

Die Mittel E22 und VP12d enthalten 100 μ Wirksubstanz pro 0,01 ccm α , 106 R und Do/II 5 μ und DC100 sogar nur 0,2 μ auf 0,01 ccm.

Schon nach den ersten Versuchen mussten wir die Fraktionen α , 106R, Do/II und DC100 auf ein Zehntel einengen um überhaupt einen Nachweis zu erbringen. Alle weiteren Chromatogramme wurden mit den folgenden Konzentrationen präpariert:

Vergleichslösungen:	0,01 ccm = 20 μ Substanz
E22:	0,01 ccm = 100 μ Substanz
VP12d :	0,01 ccm = 100 μ Substanz
α :	0,01 ccm = 50 μ Substanz
106R :	0,01 ccm = 50 μ Substanz
Do/II :	0,01 ccm = 50 μ Substanz
DC100 :	0,01 ccm = 2 μ Substanz

Jedesmal lag dieselbe Papiersorte zu Grunde: Schleicher & Schüll 2043b, ein Papier mittlerer Dicke und damit relativ langer Laufzeit, erwies sich vollauf befriedigend bezüglich Trennungsschärfe der einzelnen chromatographischen Zonen.

B. DIE LÖSUNGSMITTELSYSTEME

Was die verschiedenen Lösungsmittelkombinationen anbelangt, trafen wir empirische Auslesen.

- 1) Phenol - n/10 Salzsäure 85:15 führt zu stark erhöhten R_F - Werten; ähnliche Ergebnisse zeigt Phenol - Wasser 80:20.
Phenol - Ammoniak 97:3 erwies sich als unzulänglich; die chromatographischen Zonen waren äusserst unscharf und trotz Zusatzes von Kaliumcyanid, das eine Ausbildung schmutzig - brauner Fronten verhindern sollte, wies die Lösungsmittelfront mehr als bei den anderen Phenolkombinationen eine starke Verfärbung auf (12). Alle Phenolsysteme neigten zu einer Elongation der chromatographischen Zonen, was mit steigenden R_F - Werten im allgemeinen auftritt.
- 2) Mit Pyridin - Wasser 65:35 wurde nicht weitergearbeitet, da die Wanderungsgeschwindigkeit zu hoch war und drei Zentimeter pro Stunde stark übertraf.
- 3) Unter anderem bewährte sich generell das Lösungsmittelsystem n - Butanol - Eisessig - Wasser 4:1:1-
Bei Verwendung dieses Lösungsmittels bleiben die R_F - Werte niedrig und ermöglichen eine exakte Trennung. Eine störende Beeinflussung auf die Färbung beobachteten wir niemals, die chromatographischen Zonen zeichneten sich scharf ab und hatten nicht die Tendenz zur Schwanzbildung.
- 4) Ähnlich gute Ergebnisse erzielten wir mit Kollidin - Wasser 70:30.
- 5) Isopropylalkohol - Wasser 80:20 bewährte sich recht gut, doch neigte es zu leichten Verwaschungen und Ausbildung verbreiteter chromatographischer Zonen.

C. CHEMISCHE FARBREAKTIONEN

IHRE ANWENDUNG UND AUSWERTUNG

Die orientierenden Vorversuche ergaben, dass die allgemein gebräuchliche Farbreaktion auf Aminosäuren und Peptide, die Ninhydrinreaktion (23) sich in unserem Fall nicht besonders bewährte.

Das Besprühen des Chromatogramms mit 0,2 %iger Ninhydrinlösung in 95% Butanol und 5% Essigsäure erfordert noch ein zusätzliches Erhitzen

des Chromatogramms auf über 100 Grad. Erst bei diesen Temperaturen treten Farbdifferenzen deutlich auf. Die Reihenfolge des Sichtbarwerdens ermöglicht zwar Rückschlüsse auf die Konzentration der betreffenden Komponenten; andererseits aber treten bei diesen hohen Temperaturen doch Farbverluste auf, die uns bewogen, die β - Natriumnaphthochinonsulfonat - Farbreaktion vorzuziehen, da hier ein Erwärmen bis auf 60 Grad ausreicht.

Nach mehreren Chromatogrammversuchen, unter Verwendung verschiedener Lösungsmittelsysteme und Farbreaktionen, konnten wir auf Grund der errechneten R_F - Werte eine Anzahl von Aminosäuren und verwandten Verbindungen einwandfrei ausschliessen.

Von nun ab versuchten wir durch charakteristische Färbemethoden den Nachweis der in den Gewebsextrakten noch in Frage kommenden Eiweissbausteine zu führen.

Alle Versuche wiederholten wir mindestens einmal, um auftretende Fehler im Arbeitsgang und Färbemechanismus von vornherein auszuschalten.

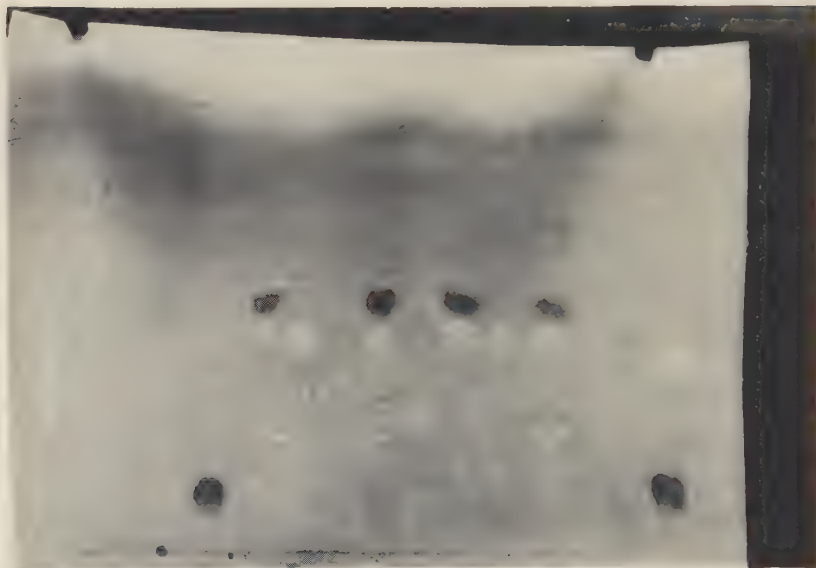
- 1) Prolin und Oxyprolin erscheinen auf Besprühen mit 0,2%igem Isatin in 4% Eisessig enthaltendem Butanol als intensiv blaue Flecken (30). Ein Chromatogramm in dieser Richtung erbrachte das Nichtvorhandensein von Prolin in den untersuchten Gewebsextrakten.
- 2) Tryptophan lässt sich besonders charakteristisch durch eine gesättigte p - Dimethylaminobenzaldehydlösung in 3%iger wässriger Salzsäure anfärben (31). In einem Chromatogramm, das in Isopropylalkohol - Wasser 80:20 lief, erschien Tryptophan in der Testsubstanz als hellgelbe Zone, war aber in keiner der untersuchten Fraktionen nachweisbar.
Kreatin und Kreatinin lassen sich bei dieser Farbreaktion als blassgelbe chromatographische Zonen nachweisen.
- 3) Eine empfindliche spezifische Färbung für Arginin und Argininpeptide stellt das Sakaguchi - Reagens dar (32).
Bei dieser Methode wird das Chromatogramm besprüht mit 5%iger Natronlauge und 0,5%igem α - Naphthol in 80%igem Alkohol und gleich darauf mit einer wässrigen Hypobromitlösung aus 100 ccm 5%iger Natronlauge und 2 ccm Brom. *

Chromatogramm 1:

Lösungsmittel: n-Butanol - Eisessig - Wasser 80:20:20

Laufzeit: 21 Stunden, Lösungsmittelfront: 31,4 cm

Entwickler: Sakaguchi - Reagens.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

1 Tryptophan	60 γ	9 α	600 γ
2 Leucin	60 γ	10 Kreatin	160 γ
3 Tyrosin	60 γ	11 E22	700 γ
4 Do/II	600 γ	12 Kreatinin	120 γ
5 Arginin	60 γ	13 VP12d	700 γ
6 106R	600 γ	14 Phenylalanin	60 γ
7 Methionin	120 γ	15 DC100	25 γ
8 Valin	60 γ	16 Gemisch aller Testsubstanzen.	

Auswertung :

Tryptophan, R_F - Wert = 0,41, schwachrot gefärbt, verblasst zusehends und ist in den untersuchten Gewebsextrakten nicht enthalten.

Arginin mit einem R_F = 0,15, als himbeerrote chromatographische Zone, konnte in keiner der sechs untersuchten Chargen mit Sicherheit nachgewiesen werden.

In den Extrakten Do/II, 106R, α und DC100 weist die Basiszone eine schwachrötliche Färbung auf, die auf eine Störung durch das anwesende Kochsalz hindeutet und unserer Meinung nicht von Arginin herrührt.

Kreatinin hingegen gibt bei R_F = 0,48 bis auf Do/II in allen Fraktionen eine gerade noch sichtbare Hellrotfärbung, die ebenfalls abblasst und sich mit Methionin überschneidet.

Kreatin mit R_F = 0,30 gibt eine schwache Himbeerrotfärbung bei α und VP12d.

Eine intensivere Rotfärbung mit einem jeweiligen R_F = 0,54 lässt sich bis auf DC100 in allen Chargen nachweisen. Diese chromatographischen Zonen liegen etwa 2 cm über denen des Kreatinins. Der R_F - Grösse nach zu schliessen dürfte es sich wahrscheinlich um Phosphokreatin und nicht etwa um ein phosphoryliertes Arginin handeln. Vermöge seiner längeren Seitenkette dürfte das Phosphokreatin eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit besitzen, was sich in den R_F - Werten zeigt und zu Gunsten unserer Annahme gewertet werden kann. Nachweisreaktionen in dieser Richtung konnten wir in Ermangelung der Vergleichssubstanzen nicht fortsetzen.

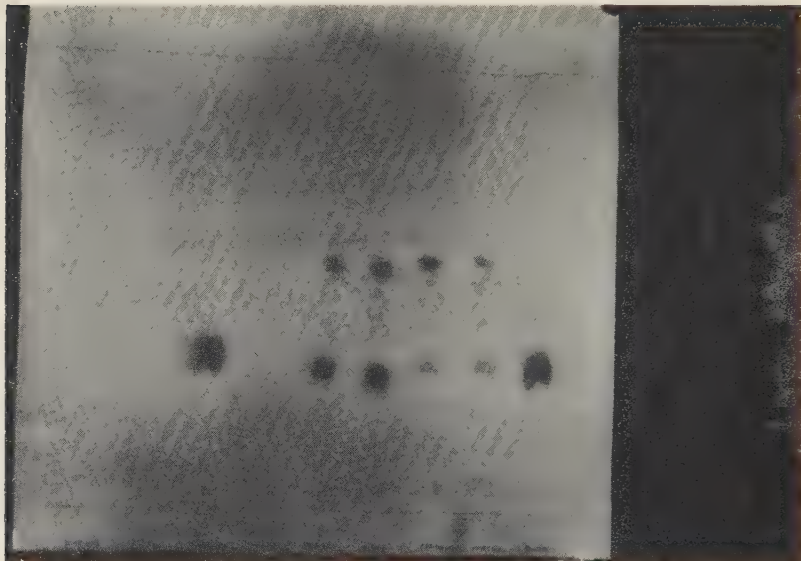
4) Kreatin und Kreatinin ergeben bei Besprühen mit Nitroprussid - Natrium eine Kirschrotfärbung. Daher verwendet man zu ihrem Nachweis alkalisches Ferricyanid - Nitroprussid (je ein Teil 10%ige Natronlauge, 10%ige Nitroprussid - Natriumlösung, 10%ige Ferricyanidlösung und dazu 9 Teile destilliertes Wasser), obwohl diese Färbetechnik eigentlich zur Identifizierung von Arginin und Tryptamin gedacht ist (33).

Chromatogramm 2 :

Lösungsmittel: n- Butanol - Eisessig - Wasser 80:20:20

Laufzeit: 21 Stunden, Lösungsmittelfront: 31,3 cm

Entwickler: alkalisches Ferricyanid - Nitroprussid.



1 2 3 4 5 6 7 8 9

1 DC100	25	γ	6 α	600	γ
2 Do/II	600	γ	7 E22	700	γ
3 Kreatin	120	γ	8 VP12d	700	γ
4 Kreatinin	80	γ	9 Gemisch aller Testsubstanzen.		

Auswertung :

Kreatin färbt sich kirschrot und zeigt einen R_F von 0,31.

Bis auf DC100 und Do/II gelang uns in allen Chargen auch hier der Nachweis.

Kreatinin als kirschrote Zone mit einem $R_F = 0,48$ erscheint in 106R, ~~al~~, E22 und VP12d.

Die im letzten Chromatogramm beschriebene hellrote Zone mit $R_F = 0,54$ tritt bei dieser Färbung in allen Gewebsextrakten auf.

5) Für den gleichzeitigen Nachweis von Histidin, Histamin und Tyrosin in einem Chromatogramm empfiehlt sich die PAULY - sche Diazoreaktion (34). Ausserdem reagieren bei dieser Farbreaktion aromatische Amine, Phenole und Thyramin, sofern das Chromatogramm nicht mit phenolhaltigen Lösungsmitteln entwickelt wird (35). Letztere stören die empfindliche Färbung durch Auftreten hochgradiger Farbverluste, so dass ein Nachweis fast unmöglich wird.

Aus mehreren Vorschriften zur Diazotierung wählten wir folgende Modifikation:

Wir besprühten das Chromatogramm mit gesättigter Natriumbikarbonatlösung, trockneten es im Warmluftstrom und besprühten daraufhin mit diazotierter Sulfanilsäure (0,5 g Sulfanilsäure + 95 ccm Wasser + 5 ccm rauchende Salzsäure, dazu 5%ige Natriumnitritlösung im Verhältnis 1:2).

Chromatogramm 3:

Lösungsmittel: Kollidin - Wasser 70:30

Laufzeit: 24 Stunden, Lösungsmittelfront : 26,8 cm

Entwickler: Diazotierte Sulfanilsäure.



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 DC100				25			8 106R			500		
2 Tyrosin				80			9 Kreatin			160		
3 Tryptophan				120			10 α			500		
4 E22				700			11 Kreatinin			120		
5 Histidin				15			12 Do/II			500		
6 VP12d				700			13 Gemisch aller Testsubstanzen.					
7 Histamin				15								

Auswertung :

Tyrosin wird als rosarote, stark elongierte Chromatographische Zone mit einem $R_F = 0,45$ sichtbar und ist in keiner Fraktion enthalten, ebenso wie

Histamin als kirschroter Fleck mit $R_F = 0,34$.

Tryptophan und Kreatinin mit einem jeweiligen $R_F = 0,43$ überschneiden sich. Kreatinin erscheint als gelber Fleck in E22, VP12d, 106R und α . Tryptophan bildet eine orange gefärbte Zone in der Testsubstanz und kann auf Grund der Eigenfarbe aus den untersuchten Gewebsextrakten ausgeschlossen werden.

Die kirschrote Zone des Histidins, $R_F = 0,14$, zeichnet sich im E22 als Doppelzone derselben Farbe ab, im VP12d ist diese Doppelzone nur angedeutet.

Die Extrakte DC100 und Do/II liessen sich nicht anfärben, ebensowenig wie Kreatin.

6) In unseren Versuchen kam besonders die Färbung mit β -Natrium-Naphthochinonsulfonat zur Anwendung. Ihre Empfindlichkeit soll fast die der Ninhydrin-Reaktion erreichen (36).

Wir sind diesbezüglich folgender Meinung : eine Färbemethode, die Nachweisreaktionen ab 5 μ g gestattet, genügt in unserem Falle vollauf, sofern überhaupt eine charakteristische, unterschiedliche Anfärbung der einzelnen Aminosäuren möglich ist. Dies fanden wir bei der GIRI-Reaktion bestätigt und gaben ihr den Vorzug.

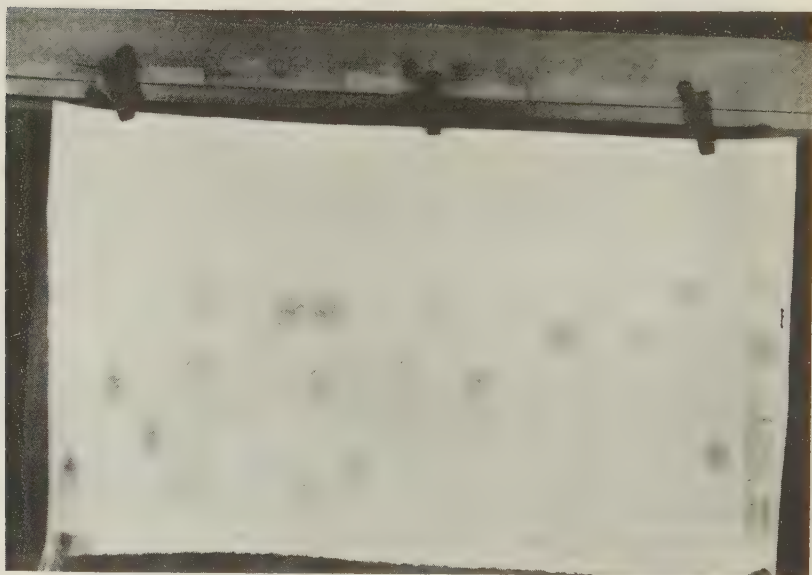
Wir arbeiteten nach folgender Methode (37):

Wir tauchten das präparierte Chromatogramm in die Reagenslösung I (0,3 g β -Natrium-Naphthochinonsulfonat in 10 ccm Wasser gelöst und mit Aceton auf 300 ccm aufgefüllt) und trockneten es bei 60 Grad im Warmluftstrom, wobei rosafarbene Flecke ohne Farbunterschied auftraten. Bis zur Entwicklung intensiver Farben (1 bis 2 Minuten) brachten wir das Chromatogramm in die Reagenslösung II (6 ccm wässrige 5 n-Natronlaufe, auf 300 ccm mit 96%igem Alkohol aufgefüllt).

Chromatogramm 4:

Lösungsmittel: Isopropylalkohol - Wasser 80:20

Laufzeit: 21 Stunden, Lösungsmittelfront: 27 cm

Entwickler: β -Natrium - Naphthochinonsulfonat.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

1 Asparaginsäure	10 g	10 α	600 g
2 Threonin	30 g	11 Tryptophan	40 g
3 Glutaminsäure	15 g	12 DC100	25 g
4 E22	700 g	13 Methionin	40 g
5 Kreatin	150 g	14 106R	600 g
6 Kreatinin	80 g	15 Valin	20 g
7 VP12d	700 g	16 Leucin	20 g
8 Histidin	15 g	17 Serin	40 g
9 Tyrosin	40 g	18 Gemisch aller Testsubstanzen.	

Auswertung :

Sämtliche chromatographische Zonen treten in diesem Lösungsmittel verbreitert zutage; starke Verwaschungen zeigen sich in α , DC100 und 106 R.

Asparaginsäure: hellblau, $R_F = 0,11$, - nirgends nachweisbar.

Threonin: blaugrün, $R_F = 0,35$, - enthalten im E22 und VP12d.

Glutaminsäure: grün, $R_F = 0,18$, - enthalten in E22.

Kreatin: violett, $R_F = 0,29$, - verblasst zusehends bereits nach Minuten.
enthalten in E22, VP12d, , DC100 u. 106R

Kreatinin: intensiv violett, $R_F = 0,55$, verblasst ebenfalls sehr rasch,
- enthalten in E22, VP12d, DC100, α u. 106R

Histidin: blaugrün, $R_F = 0,08$ - enthalten in E22 und VP12d.

Tyrosin: grau, $R_F = 0,39$ - nirgends nachweisbar.

Tryptophan: braun, $R_F = 0,38$ - nirgends nachweisbar.

Methionin: blau, $R_F = 0,52$ - nirgends nachweisbar.

Valin: grün, $R_F = 0,53$ - nirgends nachweisbar.

Leucin: blaugrün, $R_F = 0,65$ - enthalten in E22.

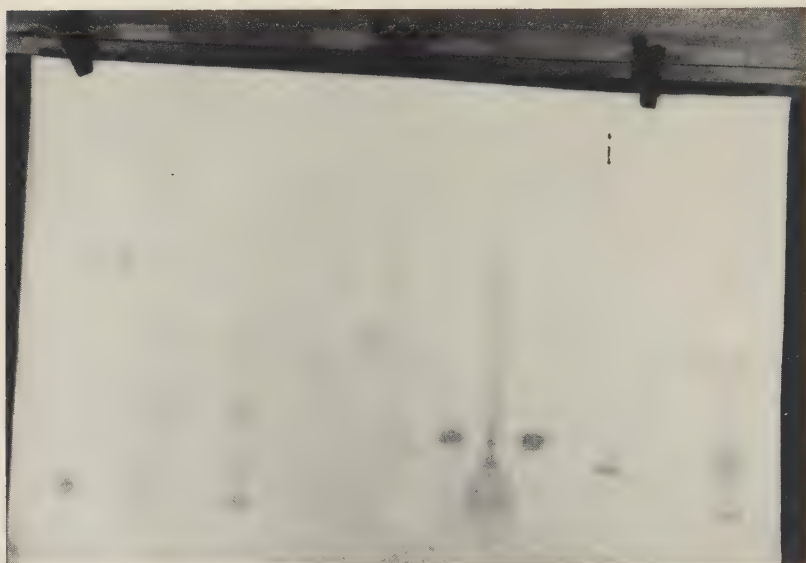
Serin: dunkelblau, $R_F = 0,23$ - bei diesem Lösungsmittel in sämtlichen
Chargen nicht nachweisbar.

Tryptophan und Tyrosin, mit fast den gleichen R_F - Werten wie Threonin konnten in diesem Chromatogramm hinsichtlich unterschiedlicher Farbwerte ausgeschlossen werden. Im folgenden Chromatogramm ist eine Differenzierung auch bezüglich ihrer R_F - Werte gegeben.

Chromatogramm 5:

Lösungsmittel: n- Butanol - Eisessig - Wasser 80:20:20

Laufzeit: 21 Stunden, Lösungsmittelfront: 31,2 cm

Entwickler: β -Natrium - Naphthochinonsulfonat

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

1 Histidin	20 γ	10 Glutaminsäure	15 γ
2 Leucin	20 γ	11 Do/II	600 γ
3 E22	700 γ	12 Threonin	30 γ
4 Kreatinin	100 γ	13 DC100	25 γ
5 VP12d	700 γ	14 Serin	30 γ
6 Kreatin	200 γ	15 α	600 γ
7 Tyrosin	40 γ	16 Methionin	40 γ
8 Tryptophan	40 γ	17 Gemisch aller Testsubstanzen.	
9 106R	600 γ		

Auswertung :

Histidin: blaugrün, $R_F = 0,12$ - enthalten in E22 und VP12d

Leucin: blaugrün, $R_F = 0,62$ - enthalten in E22, VP12d, Do/II
 α und DC100.

Kreatinin: intensiv violett, $R_F = 0,47$, verblasst bereits nach Minuten
 - enthalten in E22, VP12d, Do/II,
 DC100 und α .

Kreatin: biolett, $R_F = 0,32$, verblasst ebenfalls rasch,
 - enthalten in VP12d, 106R, Do/II und α .

Tyrosin: graublau, $R_F = 0,40$ - nirgends nachweisbar.

Tryptophan: braun, $R_F = 0,48$ - nirgends nachweisbar.

Glutaminsäure: dunkelgrün, $R_F = 0,24$ - enthalten im E22, VP12d und
 Do/II

Threonin: blaugrün, $R_F = 0,26$ - enthalten in E22 und VP12d.

Serin: dunkelblau, $R_F = 0,19$ - enthalten in E22, VP12d, Do/II u. α .

Methionin: blau, $R_F = 0,48$ - nirgends nachweisbar.

Die Extrakte 106R, Do/II, DC100 und α bilden bei Verwendung des oben genannten Lösungsmittels jedesmal grosse, scharfgezeichnete Zonen am Basispunkt, die zumeist weiss ausgespart zur Darstellung kamen. Wir glauben als Ursache dieser Störung die Anwesenheit von Neutralsalzen verantwortlich machen zu können. Nachträgliche Versuche mit einem Gemisch der Testsubstanzen in physiologischer Kochsalzlösung - ebenfalls auf ein Zehntel des Volumens eingeeengt! - erbrachten ganz gleiche, schwachgefärbte Basiszonen in gleicher Ausdehnung.

Damit gelang uns ein dreifacher Nachweis (38) :

- 1) die Klärung der Basiszone, bedingt durch das anwesende Kochsalz in höherer Konzentration,
- 2) der Beweis, dass Ionen oder Neutralsalze den Ablauf der Chromatographie stören können, je nach Menge der vorhandenen anorganischen Bestandteile und

- 3) der Beweis, dass die Gewebsextrakte 106 R, Do/II, DC100 und α durch Extraktion mit physiologischer Kochsalzlösung gewonnen wurden.

Die Extrakte E22 und VP12d hingegen bildeten keine Basiszonen aus; daraus schlossen wir, dass bei der Extraktion der Gewebe in diesen beiden Fällen an Stelle von physiologischer Kochsalzlösung destilliertes Wasser verwendet wurde.

Die starke seitliche Ausdehnung dieser Basiszonen bewirkt einerseits eine etwas verringerte Wanderungsgeschwindigkeit der darüberliegenden Zonen. Dies bedeutet: herabgesetzte R_F - Werte in Bezug auf die mitgelaufenen Testsubstanzen und musste berücksichtigt werden.

Zum anderen aber neigen die darübergelegenen Zonen zur Schwanzbildung. Je kleiner in einem Gemisch die Konzentration einer Komponente ist, umso stärker tendiert sie zur Schwanzbildung.

Wie weit eine Überlappung zustande kommt, hängt jeweils von der nächstfolgenden Zone ab (13) - in unserem Fall von der Basiszone als Zone höchster Konzentration.

D. DEUTUNG DER ERGEBNISSE

Die folgende Tabelle ist als Zusammenfassung der in den chromatographischen Versuchen gefundenen Eiweissbausteine gedacht. Sie soll zeigen, welche Substanzen wir in den Gewebsextrakten nachweisen konnten.

E22	VP12d	106R	α	Do/II	DC100
Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin
Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatinin	Kreatin
Leucin	Leucin		Leucin	Leucin	Leucin
Glutamins.	Glutamins.			Glutamins.	
Serin	Serin		Serin	Serin	
Histidin	Histidin				
Threonin	Threonin				

In chromatographischer Hinsicht am wirksamsten erwiesen sich bei allen Versuchen die Konzentrate E22, VP12d. Bezüglich ihrer Zusammensetzung konnten wir eine fast übereinstimmende Ähnlichkeit nachweisen. Im Sinne eines Konzentrationsgefälles folgen die Chargen α , 106R und Do/II hinsichtlich ihrer Wirksamkeit.

Das DC100 zeigt in allen Chromatogrammen ausser der Basiszone nur eine Kreatin - Kreatininzone und eine Spur von Leucin, soweit diese bei der überaus geringen Konzentration überhaupt noch nachweisbar sind.

Eine weitere Anreicherung des DC100 erschien uns zwecklos, da wir dadurch höchstens eine Verbreiterung der Basiszone erzielt hätten.

Dem Aufbringen von mehr Substanz auf den Startfleck war ebenfalls eine Grenze gesetzt. Es kam zu einer massiven Ausdehnung des Startflecks auf Kosten einer ungenauen Lokalisation der hochsteigenden chromatographischen Zonen. Eine weitere Differenzierung wurde somit von vornherein in Frage gestellt.

Nur deshalb arbeiteten wir mit dieser kleinen Menge Wirkstoff. Aus obiger Tabelle ist ersichtlich, dass es sich bei den untersuchten Gewebsextrakten keineswegs um Proteinhydrolysate handelt, die zur Therapie einer Substitution der essentiellen Aminosäuren im menschlichen Organismus herangezogen werden können.

Leucin, Histidin und Threonin als unentbehrliche Aminosäuren, sowie die entbehrlichen Serin und Glutaminsäure lassen sich in einigen Fraktionen nachweisen, andererseits aber ist ihr Anteil bezüglich der Gesamtwirksubstanz dermassen gering, dass auf 10 ccm Gewebsextrakt jeweils ein Maximum von 100 bis 500 μ kommt. Eine Wirkung dieser minimalen Komponenten auf den Organismus kann mit grösster Wahrscheinlichkeit verneint werden.

Beim Kreatin - Kreatininsystem hingegen liegen die Verhältnisse etwas anders. Aus Farbgleichheit und gleicher Grösse der gefundenen Zonen und der Testzonen ist ein Rückschluss auf die Konzentration der einzelnen Komponenten zulässig. Obzwar diese Ermittlung bei weitem keine quantitative Bestimmung darstellt, konnten wir doch in etwa die Kreatin-Kreatinin - und Phosphokreatinanteile bestimmen.

Ungefähr 25 bis 30 mg Kreatin - Kreatinin treffen auf 10 ccm der Fraktionen E22 und VP12d, während 10 cm α , 106R und Do/II annähernd 3 mg Kreatin enthalten. Im DC100 ist der Anteil nicht höher als 150 μ .

Diese relativ hohe Konzentration, zumindest in Bezug auf die übrigen Aminosäuren, bestärkte uns darin, das Kreatinsystem in die Deutung der untersuchten Gewebsextrakte einzubeziehen.

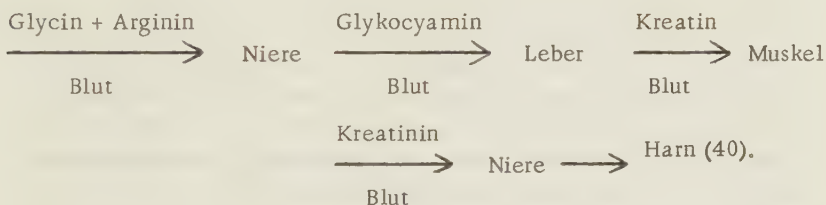
E. KREATIN - KREATININ

1) Bildung des Kreatins

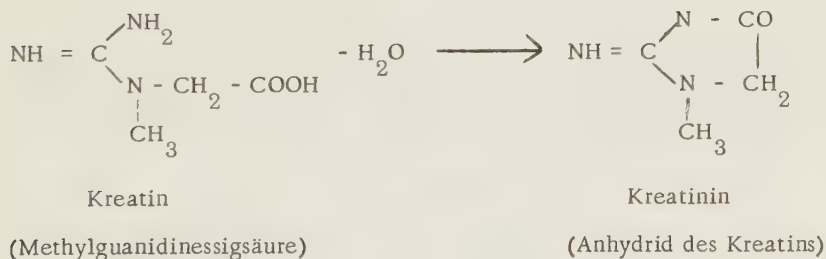
Das Kreatin, ein Abbauprodukt des Eiweissstoffwechsels, wird im Organismus durch die Aufeinanderfolge zweier Reaktionen gebildet:

Die Guanidingruppe der exogenen Aminosäure Arginin wird auf das Glycin übertragen. Das in der Niere entstandene Guanidinazetat (Glykocyamin) wird hierauf in der Leber N- methyliert, wobei die Methylgruppe aus der in der Leber entmethylierten Aminosäure Methionin geliefert wird. Die Synthese der Methylguanidinessigsäure (Kreatin) erfolgt also in der Leber; der für diese Synthese nicht verwendete Rest der Aminosäuren wird desaminiert und die N - Atome werden in Harnstoff übergeführt (39).

Die Energiequelle für alle diese Vorgänge ist die Adenosin - Triphosphorsäure.



Durch Abbau des Kreatins geht dieses über in das Anhydrid Kreatinin, ein Stoffwechselendprodukt und wird als harnfähige Substanz ausgeschieden.



2) Vorkommen, Speicherung und Ausscheidung

Der Grossteil des im Körper aufgebauten Kreatins liegt in Form von Phosphokreatin vor im Muskelgewebe, in der Leber, im Gehirn und im Blut. Das Gesamtmuskulkreatin besteht aus $\frac{4}{5}$ Phosphokreatin und $\frac{1}{5}$ freiem Kreatin. Der Gehalt des Muskels an Phosphokreatin schwankt zwischen 0,3 und 0,7 %; er ist am grössten im schnell reagierenden weissen Skelettmuskel und sehr gering im Herzmuskel (41).

Kreatin und Kreatinin machen im Gehirn 175 mg% aus, wobei auch hier ein grosser Teil als Kreatinphosphorsäure vorliegt.

Eine Verabfolgung von Kreatin über längere Zeit hinaus hat einerseits eine verstärkte Kreatinurie zur Folge, zum anderen aber können im besonderen Masse die Leber, das Muskelgewebe und die Nieren Kreatin auf das Fünffache ihres Normalgehaltes anreichern (50). Die Tatsache dieser Speicherung, wie auch die Beobachtung, dass gesunde Menschen per os aufgenommenes Kreatin restlos zurückhalten (43), unterbaute unsere Hypothese bezüglich einer, wenn auch geringen Kreatinwirkung bei der Applikation der untersuchten Gewebsextrakte.

Der Kreatin - Kreatininspiegel des Blutes ist relativ konstant und variiert nur dann mit der Nahrungsproteineinnahme, wenn diese in Form von Fleisch überaus reichlich zugeführt werden (46)

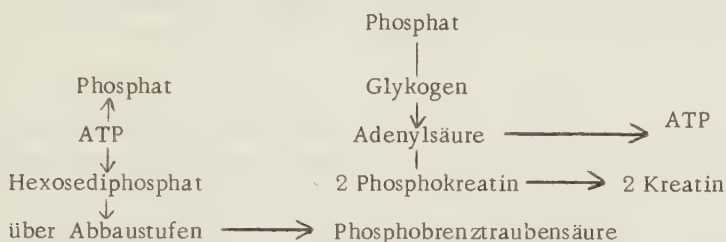
Je nach der Zufuhr von Kreatin wird Kreatinin dauernd in geringem Masse ausgeschieden, Kreatin hingegen nur nach schwerer Muskelarbeit und pathologisch bei Unterernährung, starkem Vitaminmangel, bei Ausschaltung der Kohlehydrate aus der Nahrung, beim Diabetes mellitus und bei der progressiven Muskeldystrophie (44).

3) Kreatin als Energiespeicher im Kohlehydratabbau

Das Kreatin, in Form seines energiereichen Phosphates, spielt im Stoffwechsel des Muskels, aber auch in zahlreichen anderen Organen eine wichtige Rolle in Verbindung mit der Adenosin - Triphosphorsäure (ATP). Das Adenylsäuresystem ist nämlich neben der Kreatinphosphorsäure der

wesentlichste Phosphorsäure - Donator und neben der Glukose der bedeutendste Energiespender im intermediären Stoffwechsel (45).

Im Kohlehydratstoffwechsel ist die Glykogenolyse nach PARNAS ein Vorgang, der sich aus zusammengehörigen Umsetzungen phosphorhaltiger und phosphorfreier Derivate der Glukose, des Kreatins und der Adenylsäure vollzieht (47) nach folgendem Schema :



Aus diesem Schema geht hervor, dass die ATP aus Phosphokreatin wieder aufgebaut wird, wobei dieses selbst in Kreatin und Phosphat zerfällt.

- 1) $2 \text{ Kreatin} + 2 \text{ Phosphorsäure} \longrightarrow 2 \text{ Phosphokreatin}$
- 2) $\text{ATP} + \text{Glukose} \longrightarrow \text{Adenosinmonophosphorsäure} + \text{Hexosediphosphat}$
- 3) $\text{Adenosinmonophosphorsäure} + \text{Phosphokreatin} \longrightarrow \text{ADP} + \text{Kreatin}$
- 4) $\text{ADP} + \text{Phosphokreatin} \longrightarrow \text{ATP} + \text{Kreatin}$

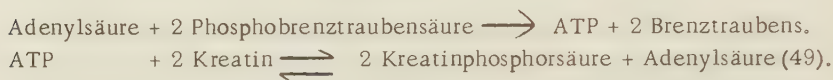
Die verschiedenen Phosphorylierungsstufen stehen in der Zelle nebeneinander; sie unterliegen einem ständigen Übergang von der einen Substanz zur anderen, stehen also in einem Fließgleichgewicht (48).

4. Bedeutung für die Muskelkontraktion

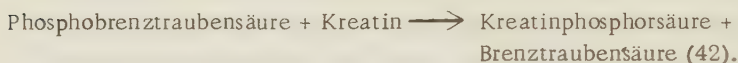
Die ATP nimmt im Kohlehydratabbau des Muskels eine zentrale Stellung ein. Als schneller Energieüberträger für explosionsartige Muskelkontraktionen ist sie unbedingt notwendig, wobei nicht nur der Muskel glykogenärmer wird, sondern auch das Adenylsäuresystem einem gewissen Verbrauch unterliegt.

Die Bedeutung des Kreatinsystems beruht auf seiner Funktion als Energiespender. Durch die Aufspaltung von 1 Mol Phosphokreatin in Kreatin und Phosphorsäure wird bei der Muskelkontraktion eine Energiemenge von 12000 cal freigesetzt.

Das Kreatinsystem dient als Phosphatreserve für das Adenylsäuresystem. Bei erschöpfender Muskelarbeit wird zuerst das Phosphokreatin aufgebraucht und dann erst das Adenylsäuresystem angegriffen. Demnach erfolgt in der Restitutionsphase zuerst die Resynthese des Phosphokreatins nach der Formel:



oder bei Anwesenheit von ATP die direkte Umesterungsreaktion:



Im Gehirn dürfte dasselbe Gleichgewicht zwischen Adenosinpolyphosphaten und Phosphokreatin bestehen. Hier unterliegt das Phosphokreatin einem rapiden Abbau, was vermutlich mit der Phosphorylierung von Glukose Hand in Hand geht, denn schlagartig mit dem Abbau tritt ein Anstieg von Hexosephosphaten auf (51).

Erst nach Entleeren des Phosphokreatinreservoirs und damit mangelhafter Auffüllung der ATP - Bestände werden diese selbst aufgebraucht.

5) Die Wirkung des Kreatinsystems und die der Gewebsextrakte

Das Kreatinsystem in Form des Phosphagens dient als Energiespeicher und indirekt über das ATP - System als Überträger im Gesamtkohlehydratabbau, im Muskelgewebe und im Gehirn.

Die Verwendung des Kreatins in der Behandlung des diabetischen Komas bei gleichzeitiger Insulinzufuhr wird von JAHN empfohlen (52).

Die Wirksamkeit des Kreatins lässt sich theoretisch durch den Ausgleich einer ungenügenden Phosphorylierungsmöglichkeit erklären und ist praktisch auf eine Stabilisierung des Adenylsäuresystems zurückzuführen.

Das bewog uns, die untersuchten Gewebsextrakte von dieser Seite zu betrachten. Durch tägliche intravenöse Applikation von 10 ccm der Fraktionen α , 106R und DC100 über eine längere Zeitspanne zeigte sich bei den Patienten klinisch verschiedentlich Besserung der objektiven und subjektiven Beschwerden (53).

- a) Bei den meisten Patienten kam es bereits nach Tagen zu einer Steigerung des Allgemeinbefindens.
- b) Schlafstörung und nervöse Unruhe konnten sichtlich beseitigt werden.
- c) Patienten mit vegetativer Dystonie sprachen mit wechselndem bis befriedigendem Erfolg an.
- d) Bei Endangitis obliterans konnten wir nur einen sehr mässigen Erfolg verzeichnen, während
- e) der Grossteil der Patienten für die Dauer der Behandlung mit einer deutlichen, vor allem systolischen Blutdrucksenkung reagierte.

Fälle mit echter Angina pectoris, Asthma bronchiale und Diabetes mellitus kamen nicht zur Behandlung, so dass wir die Auswirkung der Gewebsextrakte auf diese Krankheiten leider nicht beobachten konnten. Die unserer Meinung nach wirksamere Konzentrate E22 und VP12d wurden bedauerlicherweise nicht zur Therapie herangezogen. So konnten wir zwischen den niedrig- und hochkonzentrierten Gewebsextrakten in klinischer Hinsicht in Bezug auf ihre Wirkungsbreite auf den kranken Organismus keinen Vergleich anstellen.

Die relativ hohe Kreatinkonzentration in den Extrakten E22 und VP12d und die beachtliche in den Mitteln α , 106R und Do/II lässt den Schluss zu, dass eine Anwendung dieser Fraktionen eine leichte Erhöhung des Kreatinspiegels im Organismus bewirken kann. Eine parenterale Zufuhr des Kreatins und besonders des Phosphokreatins dürfte nicht zuletzt auf Grund der Speicherung in der Leber das Kreatinreservoir auffüllen und somit eine Einsparung und eine Stabilisierung der ATP - Bestände zur Fol-

ge haben. Für eine solche, indirekte ATP - Wirkung sprechen die angeführten therapeutischen Erfolge, insbesondere die charakteristische Blutdrucksenkung für die Dauer der Behandlung.

Adenylsäureverbindungen selbst entfalten keine therapeutischen Dauererfolge, ausser wenn sie aus irgendeiner Quelle ständig in den Kreislauf abgegeben werden (54).

Wir sind der Meinung, dass die Anreicherung des Organismus mit Phosphokreatin als solche Quelle anzusehen ist, da sie ATP - einsparend und sogar fördernd wirkt, was die weitere Synthese von ATP betrifft.

Versuche in dieser Richtung, besonders bei Zuckerkrankheit und Angina pectoris müssten noch angestellt werden, um diese Hypothese zu unterbauen.

Zu bedenken ist ferner, ob die intravenöse Verabfolgung bei den Patienten nicht auch eine psychologische Wirkung und eine damit verbundene Besserung der Beschwerden auszulösen vermag.

Ausserdem muss die Einwirkung der in den Gewebsextrakten enthaltenen biogenen Stimulatoren einkalkuliert werden. Dass diese Faktoren bei der geringen Wirksubstanz für die gezeitigten Erfolge allein verantwortlich gemacht werden können, erscheint uns nicht wahrscheinlich.

Dass sie auf den Gesamtorganismus allgemein stimulierende Einflüsse haben, wollen wir keineswegs abstreiten.

Wie weit aber die biogenen Stimulatoren und das Kreatin - Adenylsäuresystem ineinandergreifen und sich überschneiden, können wir nicht mit Sicherheit abgrenzen - weitere, zielstrebige Versuche auf diesem Gebiet müssen noch unternommen werden, um eine endgültige Klärung herbeizuführen.

IV ZUSAMMENFASSUNG

Die Gewebsextrakte E22, VP12d, α -106R, Do-II und DC100 erweisen sich hinsichtlich ihrer chromatographischen Wirksamkeit als verschiedenen im Sinn eines Konzentrationsgefälles.

Die mit Wasser gewonnenen Konzentrate E22 und VP12d besitzen Ähnlichkeit, die mit Kochsalzlösung extrahierten Fraktionen α , 106R und Do/II zeigen annähernd gleichen Aufbau.

Bei allen Gewebsextrakten gelingt der Nachweis, dass es sich nicht um Gemische lebensnotwendiger Aminosäuren handelt.

In allen Fraktionen lässt sich Kreatin, wie auch Kreatinin zur Darstellung bringen, während die Aminosäuren Leucin, Serin, Histidin, Threonin und Glutaminsäure, wenn überhaupt, so nur in Spuren nachweisbar sind.

Ein chromatographischer Nachweis von Kreatin - Kreatinin kann geführt werden mit :

- p - Dimethylaminobenzaldehyd,
- α - Naphthol in wässriger Hypobromitlösung (Sakaguchi),
alkalischem Ferricyanid - Nitroprussid und
- β - Natrium - Naphthochinonsulfonat (Giri)

Auf Grund der relativ hohen Konzentration an Kreatin kann eine klinische Wirkung dieser Komponente angenommen werden.

Das parenteral zugeführte Kreatin wird im Organismus gespeichert und wirkt auf das Adenylsäuresystem, indem es zu einer Stabilisierung der ATP - Bestände führt

Die aufgezeigten Behandlungsergebnisse der Gewebsextrakte beruhen daher bis zu einem gewissen Grad auf einer indirekten ATP - Wirkung.

Eine Potenzierung der Wirkkraft erfolgt nicht zuletzt durch die in ihnen enthaltenen biogenen Stimulatoren.

LITERATURVERZEICHNIS

1.) Turba, F.:	Chromatographische Methoden in der Protein - Chemie, Springer Verlag	84 (1954)
2.) Turba, F.:	ibidem	184 (1954)
3.) Turba, F.:	ibidem	7 (1954)
4.) Turba, F.:	ibidem	4 (1954)
5.) Turba, F.:	ibidem	12 (1954)
6.) Turba, F.:	ibidem	13 (1954)
7.) Turba, F.:	ibidem	131 (1954)
8.) Turba, F.:	ibidem	146 (1954)
9.) Turba, F.:	ibidem	175 (1954)
10.) Turba, F.:	ibidem	191 (1954)
11.) Turba, F.:	ibidem	168 (1954)
12.) Turba, F.:	ibidem	132 (1954)
13.) Turba, F.:	ibidem	5 (1954)
14.) Cramer, F.:	Papierchromatographie, Verlag Chemie	9 (1954)
15.) Cramer, F.:	ibidem	22 (1954)
16.) Cramer, F.:	ibidem	26 (1954)
17.) Cramer, F.:	ibidem	12 (1954)
18.) Cramer, F.:	ibidem	25 (1954)
19.) Cramer, F.:	ibidem	22 (1954)
20.) Cramer, F.:	ibidem	24 (1954)
21.) Cramer, F.:	ibidem	36 (1954)

- | | | | | |
|------|--|--|---------------|--------|
| 22.) | Cramer, F.: | ibidem | 11 | (1954) |
| 23.) | Cramer, F.: | ibidem | 55 | (1954) |
| 24.) | Cramer, F.: | ibidem | 18 | (1954) |
| 25.) | Consden, R., A.H. Gordon u. A.J.P. Martin: | Biochemic Journal. | 38, 224 | (1944) |
| 26.) | Strain, H.H.: | Analyt. Chemie | 23, 26 | (1951) |
| 27.) | Horner, L., W. Emrich u. A. Kirscher : | Zeitschrift für Elektrochemie | 56, 987 | (1952) |
| 28.) | Wolfson, W.Q., C. Cohn u. A. Devaney : | Science | 109, 541 | (1949) |
| 29.) | Filatow, W.P.: | Die biogenen Grundlagen der Gewebstherapie, Sowjetwissenschaft, nat. wiss.Abtlg. Verlag Kultur und Fortschritt, Berlin | 1, 37 | (1952) |
| 30.) | Acher, R., C. Fromageot u. M. Jutisz: | Biochim et Biophysica Acta | 5, 81 | (1950) |
| 31.) | Block, R.J. : | Paper Chromatography New York, Academic Press Inc. Publ. | 65 | (1952) |
| 32.) | Williams, R.J.: | Biochem. Inst. Studies (Univ. of Texas, Austin) | Nr. 5109-205 | (1950) |
| 33.) | Kirby, H., H.E. Sutton, L. Cain u. J.S. Berry: | (Univ. of Texas Publ.) | Nr. 5109 - 34 | (1951) |
| 34.) | Dent, C.E.: | Biochemic Journal | 43, 168 | (1948) |
| 35.) | Block, R.J.: | Paper Chromatography | 46 | (1952) |
| 36.) | Müting, D.: | Naturwissensch. | 39, 303 | (1952) |

- 37.) Giri, K.V. u. A. Nagabushanan:
Naturwissensch. 39, 548 (1952)
- 38.) Holzapfel, W.: Dissertation in Bearb.
- 39.) Lehnartz, E. u. B. Flaschenträger:
Phys. Chemie, Der Stoff-
wechsel, 2. Teil 213 (1956)
- 40.) Lehnartz, E. u. B. Flaschenträger:
ibidem 303 (1956)
- 41.) Lehnartz, E. u. B. Flaschenträger:
ibidem 581 (1956)
- 42.) Lehnartz, E. u. B. Flaschenträger:
ibidem 771 (1956)
- 43.) Abelin, I.: Spez. Klin. -Chem. Methoden 203 (1952)
- 44.) Abelin, I.: ibidem 203 (1952)
- 45.) Abelin, I.: ibidem 203 (1952)
- 46.) Documenta Geig:
Wissenschaftl. Tabellen 304 (1955)
- 47.) Herbrand, W. u. K.H. Jaeger:
Das Adenylsäuresystem 27 (1952)
- 48.) Herbrand, W. u. K.H. Jaeger:
ibidem 21 (1952)
- 49.) Herbrand, W. u. K.H. Jaeger:
ibidem 34 (1952)
- 50.) Bodansky, M., V.B. Duff u. C.L. Herrmann:
J. biol. Ch. 115, 641 (1936)
- 51.) Richter, D. u. R.M.C. Dawson:
Biochem. J. 44, XLVII (1949)
- 52.) Jahn, D.: Münchener Med. Wochenschrift 26 1197 (1952)
- 53.) Schmidt, E.: Dissertation in' Bearb.
- 54.) Herbrand, W. u. K.H. Jaeger:
Das Adenylsäuresystem 57 (1952)

Lebenslauf

Ich wurde am 11. 6. 1932 als Sohn des praktischen Arztes Dr. Stefan Kaul und seiner Gattin Margarete geborene Emeritzky, in Leutschau, CSR geboren und evangelisch getauft. In Käsmark, CSR, dem Heimatort meiner Eltern, besuchte ich vier Klasen Volksschule und zwei Klasen des Realgymnasiums.

Im Herbst 1944 wurden wir nach Rossatz, Österreich, evakuiert und im Frühjahr des folgenden Jahres flohen wir vor den Russen nach Niederalt-eich in Niederbayern. Von hier aus besuchte ich die Oberschule in Deg-gendorf und legte 1951 das Abitur ab, nachdem mein Vater hier seine Praxis eröffnet hatte.

An der Montanistischen Hochschule in Leoben studierte ich zwei Seme-ster Hüttenwesen.

Im Wintersemester 1952/53 begann ich in München mit dem Studium der Medizin, bestand im April 1955 das Physikum und legte 1958 ander Ludwig - Maximilians - Universität das Medizinische Staatsexamen mit Erfolg ab.

